

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Regeneración de plántulas de chalote (*Allium cepa* var. *aggregatum*)
libres de los virus Latente del Chalote y del Enanismo Amarillo de la
Cebolla por medio de cultivo de meristema apical y quimioterapia**

Darío Xavier Ramírez Villacís

María de Lourdes Torres, Ph.D., Directora de Tesis

Tesis de grado presentada como requisito
para la obtención del título de Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Quito, Mayo 2012

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

Regeneración de plántulas de chalote (*Allium cepa* var. *aggregatum*) libres de los virus Latente del Chalote y del Enanismo Amarillo de la Cebolla por medio de cultivo de meristema apical y quimioterapia

Darío Xavier Ramírez Villacís

María de Lourdes Torres, Ph.D.

Directora y Miembro del Comité

Venancio Arahana, Ph.D.

Miembro del Comité

Carlos Ruales, MSc.

Miembro del Comité

Stella de la Torre, Ph. D.

Decana del Colegio de Ciencias

Biológicas y Ambientales

Quito, Mayo del 2013

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído la Política de Propiedad Intelectual de la Universidad San Francisco de Quito y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo de investigación quedan sujetos a lo dispuesto en la Política.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma: _____

Nombre: Darío Xavier Ramírez Villacís

C. I.: 1722780127

Lugar: Quito-Ecuador Fecha: Mayo de 2013

Resumen

La cebolla chalote (*Allium cepa* var. *aggregatum*) es una de las variedades botánicas derivadas de la especie *Allium cepa*, posee características de interés como un alto contenido de sólidos (16-33%), una consistencia más dura y un sabor más astringente en comparación a la cebolla común (*Allium cepa* var. *cepa*). En Ecuador no se la registra como una variedad diferente a la cebolla roja. En el 2012, el cultivo total a nivel nacional para la cebolla roja fue 2516,17 Ha con una producción de 67300 t, sin embargo, esta cantidad no fue suficiente para abastecer el mercado interno. Uno de los principales problemas de este cultivo son las enfermedades virales que reducen la productividad y la calidad del producto final.

En este estudio se estableció un protocolo eficiente de detección de los virus latente del chalote y del enanismo amarillo de la cebolla utilizando RT-PCR y primers específicos. También, se desarrolló un protocolo para la producción de plántulas libres de virus por medio del cultivo de meristemas y quimioterapia. Para la regeneración de meristemas se utilizó el medio MS + NAA 5uM, kinetina 10uM, sacarosa 30g.L⁻¹, benomil 1500mg.L⁻¹ y agar 6g.L⁻¹. Luego de cuatro semanas se pasó las plántulas a un medio MS + sacarosa 30g.L⁻¹ y agar 6g.L⁻¹ para la formación de raíz. Después de cuatro semanas más, se pasó los explantes a un medio MS + sacarosa 60g.L⁻¹, carbón activado 5g.L⁻¹ y agar 6g.L⁻¹ para la formación de bulbo. Con esta técnica se logró generar un 29% de plantas libres de virus. Cuando se combinó el cultivo de meristemas con quimioterapia (ribavirina 50 mg.L⁻¹) se aumentó el porcentaje de limpieza de virus al 40%. Al eliminar los problemas producidos por las enfermedades virales en chalote, se espera suplir la necesidad del mercado nacional y llegar a mercados internacionales donde tiene un mayor precio.

Abstract

The shallot onion (*Allium cepa* var. *aggregatum*) is one of the botanical varieties of the species *Allium cepa*. It possesses traits of interest such as a high solid content (16-33%), a hard consistency and a more astringent flavor in comparison with the common onion (*Allium cepa* var. *cepa*). In Ecuador, this variety is not reported as a separate one from the red onion. In 2012, total red onion cultivation nationwide reached 2516,17 Ha with a production of 67300 TM. However, this amount was not enough to supply the local market. One of the main problems with this crop is viral diseases, which reduce production and the final quality of the product.

This study established an efficient protocol for the detection of shallot latent virus and onion yellow dwarf virus using RT-PCR and specific primers. Also, a protocol was developed for the production of virus-free plants obtained from meristem culture and chemotherapy. For the meristem regeneration, MS medium supplemented with NAA 5uM, kinetin 10uM, sacarose 30g.L⁻¹, benomil 1500mg.L⁻¹ and agar 6g.L⁻¹ was used. After four weeks, the plantules were transferred to MS medium + sacarose 30g.L⁻¹ and agar 6g.L⁻¹ for root formation. After four additional weeks, explants were transferred to MS medium + sacarose 60g.L⁻¹, active carbon 5g.L⁻¹ and agar 6g.L⁻¹ for bulb formation. With this technique, we were able to obtain 29% of virus-free plants. When meristem culture was combined with chemotherapy (ribavirin 50 mg.L⁻¹), the virus elimination percentage increased to 40%. By eliminating the problems produced by viral diseases in shallots, we expect to fulfill the supply needs of the local market and make the product available in foreign markets, where its price is higher.

Tabla de Contenidos

1	Introducción	1
1.1	Género <i>Allium</i>	1
1.2	<i>Allium cepa</i>	2
1.3	<i>Allium cepa</i> variedad <i>aggregatum</i>	2
1.4	Importancia del cultivo de chalote en el Ecuador.....	4
1.5	Enfermedades virales	5
1.5.1	Métodos de detección de virus en plantas.	5
1.5.2	Producción de plantas libres de virus	7
1.5.3	Virus del enanismo amarillo de la cebolla (onion yellow dwarf virus – OYDV)..	8
1.5.4	Virus latente del chalote (Shallot Latent Virus – SLV)	11
2	Objetivo General	14
3	Objetivos Específicos	14
4	Área de estudio.....	14
5	Justificación.....	15
6	Materiales	17
6.1	Colección del material vegetal.....	17
6.2	Identificación de los virus SLV y OYDV	17
6.2.1	Extracción de ARN total de hojas de chalote	17
6.2.2	Cuantificación y visualización de bandas de ARN total	18
6.2.3	Síntesis de la primera hebra de ADNc viral	18
6.2.4	Amplificación de ADN viral mediante PCR	18
6.2.5	Electroforesis en gel de agarosa	19
6.3	Cultivo in-vitro de chalote	19
6.3.1	Desinfección e introducción in-vitro de bulbos de chalote	19
6.3.2	Limpieza de virus SLV y OYDV por medio cultivo de meristema apical y quimioterapia.....	19
6.3.3	Aclimatación de plántulas in-vitro de chalote	20
7	Metodología	21
7.1	Identificación de los virus SLV y OYDV	21
7.1.1	Extracción de ARN total de hojas de chalote	21
7.1.2	Síntesis de la primera hebra de ADNc viral	21
7.1.3	Amplificación y visualización de bandas de ADN viral obtenido	22

7.2	Cultivo in-vitro de chalote	23
7.2.1	Tratamiento de frío de los bulbos de chalote previo al cultivo in-vitro ...	23
7.2.2	Desinfección e introducción in-vitro de bulbos de chalote	23
7.2.3	Cultivo de meristema y regeneración de plántulas de chalote.....	24
7.2.4	Aclimatación de plántulas de chalote	24
8	Resultados	25
8.1	Identificación de SLV y OYDV	25
8.1.1	Extracción de ARN total de hojas de chalote	25
8.1.2	Síntesis de ADNc viral, amplificación de ADN viral y visualización de bandas obtenidas para cada virus	25
8.2	Cultivo in-vitro de chalote	26
8.2.1	Desinfección e introducción in-vitro de bulbos de chalote	26
8.2.2	Cultivo de meristemas de chalote, regeneración de plántulas y aclimatación	27
8.3	Eficiencia en la regeneración de plantas de chalote libres de SLV y OYDV ..	29
9	Discusión.....	30
9.1	Identificación de los virus SLV y OYDV	30
9.2	Cultivo in-vitro de plántulas de chalote	31
9.2.1	Desinfección e introducción in-vitro de bulbos de chalote	31
9.2.2	Extracción de meristemas, regeneración de plántulas y aclimatación.....	31
9.2.3	Senescencia temprana en el cultivo de meristemas de chalote.....	34
9.3	Eficiencia en la regeneración de plantas libres de SLV y OYDV	35
10	Conclusiones.....	37
11	Recomendaciones	38
12	Bibliografía.....	39
13	Tablas	43
14	Figuras	45
15	Anexos	48

Índice de Tablas, Figuras y Anexos

Tabla 1. Primers usados para la detección viral.	43
Tabla 2. Porcentajes de contaminación obtenidos para diferentes tratamientos de desinfección de bulbos de chalote	43
Tabla 3. Porcentajes de plantas libres de virus	44
Figura 1. Esquema de regeneración de plántulas a partir de cultivo de meristemas	45
Figura 2. Electroforesis de ARN total	46
Figura 3. Detección de SLV en plantas de chalote previo al proceso de limpieza de virus	46
Figura 4. Detección de OYDV en plantas de chalote previo al proceso de limpieza de virus	47
Figura 5. Modelo de regeneración cíclica para eliminar la dominancia apical en el cultivo de meristemas	47
Anexo 1. Cuantificación de ARN total extraído de las hojas de las plantas de chalote colectadas.....	48

1 Introducción

1.1 Género *Allium*

Inicialmente el género *Allium* fue incorporado dentro de la familia Liliaceae, sin embargo, usando datos recientes obtenidos a base de análisis moleculares se ha dividido a esta familia en pequeñas familias monofiléticas. Ahora se coloca a este género dentro de la familia Amaryllidaceae (Fritsch y Friensen, 2002).

El género *Allium* posee alrededor de 750 especies (Stearn, 1992) y se compone de plantas perennes que tienen órganos subterráneos que le sirven para almacenamiento de nutrientes (bulbos, rizomas o raíces engrosadas). Las hojas se unen directamente a la base y se hallan distribuidas uniformemente. Las flores son trimericas, actinomorfas, hipóginas, los ovarios triloculares tienen dos o más óvulos por lóculo. Los compuestos que almacenan son principalmente azúcares, especialmente fructanos, pero no almidón (Fritsch y Friensen, 2002). Debido a reacciones enzimáticas durante la descomposición de las proteínas presentes en la planta se produce sulfóxido de cisteína que le da el olor característico a las diferentes especies del género (Randle y Lancaster, 2002).

El género se halla distribuido ampliamente en el hemisferio norte en zonas subtropicales; en el hemisferio sur, sólo se ha encontrado una especie (*A. dregeanum* Kth.) (Fritsch y Friensen, 2002). Una de las zonas con más diversidad se halla en el área del Mediterráneo, Asia central y Paquistán. Inicialmente el género se desarrolló en zonas abiertas soleadas, en sitios secos con moderada humedad, sin embargo en la actualidad ocupan otros nichos, como los valles interandinos en América del Sur. (Arifin *et al.*, 2000).

1.2 *Allium cepa*

Esta especie se encuentra dentro del grupo Ceba en la que se encuentran las especies de mayor interés comercial (Fritsch y Friensen, 2002; Randle y Lancaster, 2002). Se caracteriza por tener hojas cilíndricas, huecas, dísticas, en su base forman bulbos globulares o cilíndricos unidos por membranas. Los bulbos tienen un disco basal reducido a manera de rizoma. Las hojas tienen una forma casi circular, aunque pueden presentar aplanamiento en la cara adaxial, además, tienen una vaina reducida (Fritsch y Friensen, 2002).

La variación en el tamaño, los colores (rojos, blancos, amarillos, rosados, púrpuras y violetas) y formas (globulosos, en forma de botella o planos) de los bulbos denota una intensa selección artificial, que se halla relacionada directamente con variaciones de sabor y en la capacidad de formar varios bulbos (Fritsch y Friensen, 2002; Currah y Proctor, 1990). De la misma forma podemos encontrar variedades que se han adaptado a diferentes fotoperiodos y temperaturas. Por lo tanto, órganos como las flores que no se hallan bajo directa selección no muestran mayores cambios (Fritsch y Friensen, 2002).

1.3 *Allium cepa* variedad *aggregatum*

La cebolla chalote (*Allium cepa* var. *aggregatum*), denominada ‘shallot’ en inglés y ‘échalotté’ en francés, es una de las variedades botánicas derivadas de la especie *Allium cepa*. Se diferencia morfológicamente por la formación de grupos de bulbos unidos por el mismo disco basal, a diferencia de la cebolla común que solo forma un bulbo principal. Al igual que todos los tipos de cebolla, es originaría del centro y sudeste-asiático, y se repartió por el resto del mundo debido a migraciones (Fritsch y Friensen, 2002). Otra de las principales diferencias de la cebolla chalote

radica en que posee un mayor contenido de sólidos (16-33%) que la cebolla común (7-15%), lo que aumenta su contenido de ácidos grasos, azúcares y compuestos sulfurados (Currah y Proctor, 1990; Messiaen *et al.*, 1994). Esto mejora su valor gastronómico para la cocina gourmet al tener un olor y sabor mucho más astringente y una consistencia más dura (Grubben, 1994; Fritsch y Friensen, 2002). Estas características han hecho de la cebolla chalote un producto altamente valorado en el mercado europeo (Messiaen *et al.*, 1994), estadounidense (Jones y Mann, 1963) y en Sudamérica por ejemplo en Argentina (Galmarini, 1997).

Debido al alto contenido de sólidos, además de todas las propiedades organolépticas, también, se derivan propiedades nutracéticas. Se ha encontrado que los extractos de chalote tienen actividad antimicrobiana, principalmente sobre bacterias Gram-positivas (Dankert *et al.*, 1979; Currah y Proctor, 1990). Igualmente, la ingesta prolongada previene la formación de glóbulos rojos anormales en conejos con hipercolesterolemia (Tappayuthpijarn *et al.*, 1989). En estudios realizados por Caldes y Prescott (1973) se encontró la presencia de un compuesto con actividad antagonista en el desarrollo de leucemia.

El cultivo de cebolla chalote es reducido a nivel mundial, pero se encuentra localizado principalmente en países con climas templados en los que la producción de cebolla común se dificulta por la falta de épocas frías (Grubben, 1994; Currah y Proctor, 1990). Características como tolerancia a alta temperatura y humedad, resistencia a algunas enfermedades y mayor tiempo de vida de almacén, hacen que la cebolla chalote pueda ser cultivada en zonas altas de países como Indonesia, Tailandia, Uganda, Perú y Ecuador (Currah y Proctor, 1990).

La propagación de la cebolla chalote se realiza de manera vegetativa, ya que en países que no presentan cuatro estaciones es muy difícil que se produzca la floración y se forme semilla (Currah y Proctor, 1990). La falta de ciclos de reproducción sexual incrementa la persistencia de enfermedades virales (Walkey, 2002). La presencia de virus en el cultivo pueden reducir hasta el 80% de la producción por hectárea (Shibolet *et al.*, 2006). El único método disponible para erradicar virus de este tipo de cultivo está basado en el cultivo de meristemas, con el que se obtienen bulbos libres de virus que sirven como semilla para el inicio del cultivo (Lapitan *et al.*, 1991; Fletcher *et al.*, 1998).

1.4 Importancia del cultivo de chalote en el Ecuador

En el Ecuador no se reporta a la cebolla chalote como una variedad, aunque en las provincias de Chimborazo y Tungurahua se la ha cultivado como una variedad de paiteña. Para las estadísticas de producción se la reporta como parte de la cebolla roja o paiteña que se comercializa como producto fresco o seco. Se la utiliza tanto en la costa como en la sierra como parte de diferentes platillos o como un condimento general.

Los sitios de cultivo para cebolla roja registrados por el Ministerio de Agricultura son las provincias de Carchi, Imbabura, Tungurahua, Chimborazo, Manabí, Santa Elena, Azuay y Loja. El área total plantada de cebolla roja en todo el país para el 2012 fue de 2516,17 Ha y una producción de 67300 t. De la producción nacional, se destina 94,45% para el mercado, 4,18% para autoconsumo y 1,37% se usa como semilla (SINAGAP, 2013).

La provincia con mayor número de hectáreas plantadas de cebolla roja es Tungurahua con 675 Ha y la provincia con mayor producción es Loja con 33418 t. Al realizar una relación entre el total cosechado y el área utilizada se tiene que Loja tiene la

mayor productividad (52 t/Ha), seguido por Santa Elena (34 t/Ha) y al finalmente Tungurahua (17 t/Ha). Esto se debe a que la cebolla crece en climas mayormente secos, por lo que el cultivo se favorecido en Loja y Santa Elena (SINAGAP, 2013).

El principal destino de la cebolla es el mercado interno, los precios por kilogramo oscilan entre \$0,30 y \$0,50 para la cebolla fresca y entre \$0,40 y \$0,60 para la seca. El total de cebolla importada para el 2012 fue de 28132 t, un tercio de la producción del año (SINAGAP, 2013). Esto nos indica que existe una oportunidad para crecimiento de mercado, con el que se pueda solventar el consumo interno y se pueda llegar a exportar grandes cantidades de la misma, sin necesidad de ampliar la frontera agrícola.

1.5 Enfermedades virales

1.5.1 Métodos de detección de virus en plantas.

El principal método de detección de virus en plantas se basa en la identificación morfológica de las lesiones encontradas en diferentes órganos y los síntomas presentes en la planta. Esto es posible gracias a que cada virus genera una sintomatología específica (Diekmann, 1997; Salomon, 2002). Por ejemplo, en el virus del enanismo amarillo de la cebolla (Onion Yellow Dwarf Virus – OYDV), se produce la formación de manchas amarillentas a lo largo de toda la hoja formando el mosaico característico del virus. Sin embargo, otros virus como el virus latente de la chalote no presenta síntomas (Bagi *et al.*, 2012).

La detección morfológica es uno de los métodos más usados debido a la facilidad y la rapidez, ya que al realizar una inspección visual se puede determinar la presencia de virus en el cultivo (Salomon, 2002). Existen lineamientos estandarizados para la inspección visual de cargamentos o campos de cultivos de diferentes especies de

interés como el café, cacao y para todas las especies comerciales del género *Allium*. Estos lineamientos han sido establecidos por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (Food and Agriculture Organization – FAO) con el objetivo de evitar la proliferación de pestes al momento de transportar germoplasma de un país a otro (Diekmann, 1997).

Un segundo método de detección se basa en el uso de otras especies de plantas (plantas indicadoras) en las que la infección del virus produce lesiones típicas que son fáciles de identificar; de la misma manera, se usa otras especies que son resistentes al virus. Una de las especies usadas para la detección de OYDV es *Chenopodium quinoa*, en la que se forman lesiones circulares cloróticas en las hojas cuando se inocula el extracto de las hojas de la planta de cebolla infectada con ese virus (Walkey, 2002).

Al lograr aislar los virus del tejido vegetal se ha logrado crear anticuerpos para su detección serológica. El aislamiento de los virus se puede hacer por medio de cromatografía de filtración con gel de Sephadex y ultra centrifugación en columnas de gradiente de sacarosa o cloruro de cesio. El principal uso de los anticuerpos sirve para la producción de antiseros y para establecer pruebas de ELISA. Este método es rápido y fácil para usar. Sin embargo, la detección serológica tiene algunos problemas como la sensibilidad; es decir, una misma prueba no puede detectar las diferentes variantes de un mismo virus. Esto lleva a una idea errónea de que se trata de una nueva especie de virus, pero al realizar análisis moleculares se puede observar que solo se trata de pequeñas variaciones de una misma especie (Salomon *et al.*, 1996; Walkey, 2002).

Con el avance de la tecnología, el uso de la microscopia electrónica permite detectar la presencia de virus en la planta de manera directa. Este método se ve limitado por la necesidad de un especialista y la disponibilidad del equipo (Salomon, 2002).

En los últimos años, con la mejora de análisis de macromoléculas como proteínas y ácidos nucleicos, la detección molecular se ha vuelto uno de los métodos más eficientes (Walkey, 2002). Este método utiliza RT-PCR para lograr la amplificación de regiones específicas del genoma usando primers diseñados en base a secuencias conservadas. También se puede usar primers degenerados, es decir, que tienen nucleótidos cambiados para que se alineen con un mayor número de secuencias y evitar falsos negativos (Salomon, 2002). Este método se vuelve más eficiente ya que tiene una sensibilidad 10000 veces mayor que las pruebas de ELISA y requieren el uso de menor cantidad de material vegetal (Salomon *et al.*, 1996).

1.5.2 Producción de plantas libres de virus

Los tejidos meristemáticos se hallan libres de virus, debido a que no presentan uniones directas con otros tejidos como plasmodesmos, xilema o floema. Este tipo de tejido mantiene la membrana y la pared celular intacta y reciben nutrientes por medio de difusión simple o por transporte activo. Los cuales no permiten el paso de virus, ya que se trata de partículas de gran tamaño que no pueden pasar libremente por la membrana. Por lo tanto plantas regeneradas a partir de estos tejidos también serán libres de virus (Salomon *et al.*, 1996).

La extracción de las células meristemáticas es muy difícil ya que se trata de tejidos que no se pueden distinguir fácilmente del resto. De la misma manera los tejidos circundantes a estas células se hallan normalmente contaminados con virus porque presentan plasmodesmos. Debido a estas limitaciones solo un porcentaje pequeño de plantas regeneradas a partir de la extracción de meristemas serán libres de virus, de la misma manera la tasa regeneración será diferente para diferentes variedades de una misma especie (Ucman *et al.*, 1998).

El método de extracción de meristema se puede complementar con tratamientos químicos o térmicos (Salomon, 2002). Se puede adicionar al medio de cultivo ribavirina, que es un nucleótido sintético modificado que puede insertarse en el genoma viral bloqueando la replicación de nuevos genomas, sin interferir en la replicación de la célula, por lo que no se ve una disminución en la tasa de regeneración (Fletcher *et al.*, 1998). También, se puede usar tratamientos térmicos, variaciones de temperatura, que eviten el correcto ensamblaje de nuevos viriones. Sin embargo, los cambios de temperatura o el uso de temperaturas muy altas pueden afectar al desarrollo de la planta (Shiboleth *et al.*, 2006).

1.5.3 Virus del enanismo amarillo de la cebolla (onion yellow dwarf virus – OYDV)

El virus del enanismo amarillo de la cebolla es un virus filamentoso sin membrana externa, de aproximadamente 775 nm de largo y 16 nm de diámetro, formado por ARN de sentido positivo cubierto con un solo tipo de proteínas que integran la capsida (Diekmann, 1997). Pertenece a la familia Potyviridae, fue descrito por Melhus, Reddy, Henderson y Vestal en 1929. Se transmite por medio de al menos 50 especie de áfidos y por inoculación mecánica, pero no se ha reportado transmisión por medio de semillas (Salomon, 2002).

Los síntomas se presentan en las hojas formando pequeñas manchas amarillas desde la base de la hoja que se van extendiendo a lo largo de la misma mientras ésta se va desarrollando, formando un mosaico. Las hojas nuevas pueden parecer sanas pero van generando los síntomas conforme crecen. Cuando la infección es avanzada las hojas llegan a estar casi completamente cloróticas, se vuelven parcialmente flácidas y arrugadas (Diekmann, 1997). Estos síntomas se traducen en reducción de tamaño y peso

de la planta, numero de hojas, tamaño de las flores, número de semillas (Elnagar *et al.*, 2009; Bagi *et al.*, 2012), además, de retraso en el tiempo de cosecha (Lot *et al.*, 1998).

Estos síntomas pueden variar dentro de la misma especie, como lo que se encontró por Lot *et al.* (1998) al estudiar los efectos de OYDV sobre tres variedades de ajo (*Allium sativum*) en Francia. La variedad ‘Messidrome’ presentó clorosis severa en la mayoría de las hojas y las puntas de las hojas presentaron desecación prematura. Para la variedad ‘Germinor’ se vio poca formación de manchas amarillas y clorosis. Finalmente, para la variedad ‘Printanor’ la formación del mosaico era fácilmente distinguible en hojas viejas pero casi imperceptibles en brotes nuevos. La severidad de los efectos se relacionó con la pérdida de masa del bulbo en relación a plantas no infectadas. Plantas de ‘Messidrome’ que presentaron síntomas más severos tenían una reducción del 57,5% mientras que para plantas de ‘Germinor’ era del 31,6%. Sin embargo, el daño causado por la infección fue más notorio en la segunda generación del cultivo donde la pérdida de masa para ‘Messidrome’ aumento al 65,1% y para ‘Germinor’ al 47,7%. Esto indica el efecto acumulativo entre generaciones debido al aumento de la carga viral de generación en generación, debido a que la obtención de bulbos-semilla se hace de manera vegetativa (Conci et al, 2003).

La presencia de síntomas marcados permite que el virus sea fácilmente identificado por medio de inspecciones visuales, aunque se debe evaluar plantas maduras ya que los síntomas no son marcados en brotes nuevos, dando falsos negativos (Diekmann, 1997; Bagi *et al.*, 2012). En el trabajo realizado por Bagi *et al.* (2012) se logró establecer una correlación positiva entre la carga viral y el puntaje visual otorgado a la severidad de los síntomas. Para esto se calificó la severidad de los síntomas en una escala de 0 a 4, y se determinó la carga viral de acuerdo a la absorbancia a 405nm obtenida en base a pruebas DAS-ELISA. Sin embargo, se dieron casos de falsos

positivos y falsos negativos. Es importante tomar en cuenta que la detección por medio de anticuerpos no siempre incluye a todas las variantes del virus, además, que infecciones avanzadas de otros virus como el de la rayadura amarilla del puerro (leek yellow stripe virus – LYSV) pueden presentar síntomas solapantes (Salomon, 2002).

Debido a la variabilidad encontrada dentro del virus, se han hecho reportes de nuevas especies basados en las reacciones obtenidas con antisueros. No obstante, cuando se han realizado estudios moleculares se ha logrado determinar que se tratan de la misma especie (Salomon, 2002). En 1998, Tsuneyoshi *et al.*, en base a análisis de la secuencia de nucleótidos del gen la proteína de la cápside, determinaron que existían dos variantes de OYDV. La variante ‘garlic-type’ que incluye a todos los virus aislados de ajo y chalote, y que fueron reportados como OYDV; y, la variante ‘wakegi-type’ que agruparía a los virus reportados como welsh onion yellow stripe virus (WoYSV) y shallot yellow stripe virus (SYSV) aislados en diferentes especies de *Allium*.

Gracias al análisis molecular se ha logrado encontrar factores de virulencia en OYDV. En el estudio realizado por Takaki *et al.* (2006) se utilizó dos variantes del virus aisladas de ajo (*Allium sativum*) en Japón: la variante ‘G79’ que produce síntomas moderados; y, la variante ‘G5h’ que produce síntomas severos. Al comparar la secuencia de los genomas, se encontró que la variación que producía síntomas moderados no tenía la secuencia codificante para 91 aminoácidos del extremo N-terminal de la proteína HC-Pro. Esta proteína fue identificada inicialmente en el virus del mosaico del nabo (Turnip Mosaic Virus – TuMV), otro potyvirus (Kasschau *et al.*, 2003). Ésta actúa como un inhibidor de silenciadores de ARN. Este es un mecanismo de contradefensa que facilita la infección sistémica del virus, al evitar que la planta identifique al genoma del virus o los ARNm producidos por el mismo y los degrade. De la misma manera, interfiere con la actividad de miR171 de la planta, que está encargado

de la degradación de los ARNm producidos por los factores de transcripción Scarecrow-like, que participan en una correcta división celular (Di Laurencio *et al.*, 1996).

Se ha reportado este virus en todo el mundo (Elnagar *et al.*, 2009; Bagi *et al.*, 2012; Conci *et al.*, 2003; Tsuneyoshi *et al.*, 1998), con incidencias mayores al 50% para cebolla y muy cercanas al 100% para ajo (Diekmann, 1997). En Ecuador, no se ha realizado reportes sobre su detección serológica o molecular. Sin embargo, al realizar una inspección visual en el cultivo ubicado en la Granja Experimental de la Universidad San Francisco de Quito, Tumbaco-Pichincha, se encontró plantas que presentaban los síntomas característicos de la enfermedad (datos no publicados) por lo que se decidió realizar mayores estudios.

1.5.4 Virus latente del chalote (Shallot Latent Virus – SLV)

El virus latente del chalote pertenece a la familia Carlaviridae, fue descrito por Bos, Huttinga y Maat en 1978. Los viriones son filamentosos de 660 nm de largo, normalmente forman agregaciones entre ellos y son más rígidos que los viriones de los potyvirus, lo que facilita su diferenciación por medio de microscopía electrónica (Diekmann, 1997; Salomon, 2002). Se transmite por afidos, inoculación mecánica y por medio de semillas (Diekmann, 1997).

Los síntomas producidos por este virus son casi imperceptibles, por lo que la detección visual se vuelve inadecuada. El método de detección más común se basa en el uso de anticuerpos, pero se ha visto que tiene un poder reducido al no identificar todas las variantes del virus generando falsos negativos, inclusive se ha dado el reporte equivocado de nuevas especies (Diekmann, 1997).

En el estudio de van Dijk (1993) luego de analizar 96 aislamientos de 12 especies del género *Allium*, utilizando antisueros específicos y plantas indicadoras (*Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *Celosia argentea*, *Nicotiana hesperis* y *N. occidentalis*) se pudo identificar tres especies de carlavirus: el virus latente de la chalote, el virus latente del ajo (garlic latent virus – GLV) y el virus común latente del ajo (garlic common latent virus – GCLV). Se determinó que los virus descritos en Japón como garlic latent virus y asian shallot virus aislados de ajo (*Allium sativum*) y chalote (*Allium cepa* var. *aggregatum*), y el virus Sint-Jan's-onion latent virus aislados de cebolla común (*Allium cepa* var. *cepa*) en Holanda, solo eran variantes de SLV y no se trataba de especies independientes. Los aislamientos de GLV hechos en Japón en cebolla larga (*Allium fistulosum*) y rakkyo (*Allium chinense*) se los mantuvo en la misma especie; mientras que, los aislamientos de GLV en ajo elefante (*Allium ampeloprasum* var. *holmense*) de Japón y en ajo de Alemania se los agrupó como el virus común latente del ajo (GCLV).

Más adelante, en un estudio hecho por Tsuneyoshi *et al.* (1998), en base a la secuencia de amino ácidos de la proteína de la cápside, se mostró que GLV era una variante de SLV por lo que se los agrupó dentro esta especie; y, se comprobó que GCLV se trata de una especie independiente. También, se encontró variantes específicas de SLV para diferentes regiones, pero no se encontró variaciones específicas para las diferentes especies infectadas. Esto indica que la misma variante del virus es capaz de infectar a varias especies del género *Allium* dentro de una misma región.

Aunque no se han determinado efectos directos de SLV sobre los cultivos, la importancia de este virus radica en que se ha visto que los síntomas producidos por OYDV, y otros potyvirus, se ven exacerbados produciendo mayores pérdidas en los cultivos (Paludan, 1980. Conci *et al.*, 2003). En el estudio realizado en Argentina por

Conci *et al.* (2003) en ajo (*Allium sativum*) se encontró que plantas libres de virus tienen bulbos con 216% más peso y 37% más diámetro que plantas infectadas por un complejo de virus formado por SLV, OYDV y el virus de la rayadura amarilla del puerro (leek yellow stripe virus – LYSV). Si bien en este estudio no se especifica el efecto directo de SLV sobre el cultivo, se puede ver el amplio daño que pueden producir las infecciones virales combinadas.

En un trabajo previo realizado por Paludan (1980), se pudo comprobar el efecto de SLV al combinarse con otro potyvirus. El estudio se realizó en 15 campos de cultivo en Dinamarca donde se analizó la sensibilidad de la cebolla puerro (*Allium ampeloprasum*) a SLV, al virus de la Rayadura Amarilla del Puerro (Leek Yellow Stripe Virus - LYSV) y al complejo viral formado por LYSV+SLV. Se encontró que los campos de cultivo que presentaban daños más severos se hallaban infectados con el complejo SLV+LYSV, mientras que los cultivos que solo se encontraban infectados con LYSV presentaban daños moderados y los que solo tenían SLV no presentaban síntomas. En almacenamiento, la mayor pérdida se vio en bulbos provenientes de plantas infectadas por los dos virus.

Se presume que la distribución de SLV es mundial. En cebolla chalote y puerro se ha encontrado una alta incidencia, cercana al 100%, en países de Europa y Asia (van Dijk 1993; Barget *et al.* 1997). En el Ecuador no se han realizado reportes sobre la detección serológica o molecular del mismo, pero si se ha reportado recientemente en otros países de la región como Brazil (Mituti *et al.*, 2011) y Argentina (Torrico, 2010). Debido a su amplia distribución e incidencia se puede asumir que el virus se halla presente en el país, por lo que se lo tomó como parte de este estudio. Además, que puede ser uno de los factores agravantes al daño que se produce en los cultivos, ya que puede ser transmitido en conjunto con otros virus como OYDV (Conci, *et al.*, 2003).

Las enfermedades virales representan uno de los principales problemas para el cultivo de chalote, debido al deterioro en la calidad de los bulbos y la reducción de la productividad. En base a los antecedentes presentados, en este estudio se busca desarrollar un método eficiente de detección molecular de los virus OYDV y SLV; y, generar un protocolo para el cultivo in-vitro de meristemas que se pueda combinar con quimioterapia para regenerar plantas libres de los dos virus en chalote.

2 Objetivo General

Generar plántulas in-vitro de chalote (*Allium cepa* var. *Aggregatum*) libres de OYDV y SLV por medio del cultivo de meristemas apicales y el uso de ribavirina.

3 Objetivos Específicos

- Desarrollar un método de detección de los virus OYDV y SLV en plantas de chalote basado en RT-PCR.
- Desarrollar un método de regeneración de plántulas de *Allium cepa* var. *aggregatum* a partir del cultivo de meristemas apicales
- Determinar la eficiencia del cultivo de meristemas para la generación de plantas de chalote libres de SLV y OYDV
- Determinar la eficiencia del cultivo de meristemas combinado con el uso de ribavirina para la generación de plantas de chalote libres de SLV y OYDV

4 Área de estudio

El material utilizado proviene de un programa de selección de chalotes originarios de la provincia de Chimborazo y cultivados en la Granja Experimental de la Universidad San Francisco de Quito (USFQ), ubicada en la parroquia de Tumbaco,

cantón Quito, provincia de Pichincha a 2400 msnm, 78°24' longitud oeste y 00°23' latitud sur. El análisis molecular y el cultivo in-vitro se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito (Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales), Cumbayá - Ecuador.

5 Justificación

La cebolla chalote (*Allium cepa* var. *aggregatum*) se destaca sobre la cebolla común (*Allium cepa* var. *cepa*) por dos características principales: la formación de varios bulbos unidos a un solo disco basal y un mayor contenido de sólidos. El mayor número de bulbos que se producen por planta mejora la productividad de la misma además que facilita la propagación vegetativa al tener más bulbos disponibles como semilla. Mientras que, al tener una mayor cantidad de sólidos tiene mayor cantidad de azúcares, proteínas y minerales que aumentan su valor gastronómico y nutracéutico (Robledo-Pazet *et al.*, 2000; Currah y Proctor, 1990; Messiaen *et al.*, 1994).

En Ecuador, el cultivo de chalote no es muy extendido. Se lo puede encontrar de manera reducida en Tungurahua y Chimborazo. Debido a que no se lo registra como una variedad no se puede tener datos estadísticos sobre la producción, solo se tiene los datos de la cebolla paiteña o roja, en la que se agrupa también a la chalote. El cultivo de cebolla roja está extendido por todo el país, principalmente, en los valles interandinos. Sin embargo, la producción total no permite la cobertura total de la demanda del mercado, ya que es necesaria la importación de cebolla roja desde Perú (SINAGAP, 2013). Una ventaja del cultivo de chalote en el Ecuador, es la facilidad de tener varias cosechas por año lo que permite tener disponibilidad del producto de manera constante sin necesidad de grandes espacios de almacenamiento, lo que reduce el costo de producción (Currah y Proctor, 1990).

Los principales problemas que afectan al cultivo de chalote son hongos, nematodos y especialmente los virus. Las enfermedades virales producen reducción en la productividad del cultivo y en la calidad final del bulbo, reduciendo su tamaño y el tiempo de almacenamiento, que conllevan grandes pérdidas económicas (Diekmann, 1997).

Hasta el momento no se ha logrado desarrollar variedades de chalote resistentes a estos virus, como se ha logrado con hongos y nematodos (Salomon, 2002). Tampoco, se ha logrado desarrollar métodos para eliminar virus en el campo, solo puede evitar la contaminación de plantas que se hallan libres de virus por medio de métodos físicos que eviten el paso de áfidos portadores de los mismos. Este método no es efectivo a largo plazo ya que siempre se debe adquirir nuevas plantas libres de virus (Salomon et al, 1996). Además, estos problemas se ven agravados al realizar propagación vegetativa, con la que la carga viral aumenta con cada generación del cultivo, agravando los síntomas. (Diekmann, 1997).

Con estos antecedentes, en este estudio se plantea el cultivo de meristemas y el uso de quimioterapia como una opción para la producción de plantas de chalote libres de virus. De esta manera, se espera mejorar la productividad del cultivo y la calidad del producto, para que se cumpla con la demanda del mercado interno reduciendo las importaciones. Por otro lado, se puede llegar a mercados internacionales donde el precio de esta variedad de cebolla es más alto.

6 Materiales

6.1 Colección del material vegetal

Se seleccionó indistintamente plantas de chalote de las poblaciones cultivadas en la Granja Experimental de la Universidad San Francisco de Quito que presentaban las características típicas de la infección de SLV y OYD, siguiendo los lineamientos establecidos por la FAO/IPGRI Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm of Allium (Diekmann, 1997). Las hojas de las plantas de chalote fueron utilizadas para la extracción de ARN total y la posterior detección molecular de los dos virus, mientras que los bulbos fueron almacenados a 4°C para su posterior uso.

Se colectó e identificó bulbos de chalote de las familias de selección, 11S03 y 11S04. Cada familia fue establecida a partir de una sola planta cosechada en enero de 2011 en la Granja Experimental de la USFQ como parte del programa de mejora genética de esta especie. Estos bulbos fueron almacenados a 4°C para su posterior uso.

6.2 Identificación de los virus SLV y OYDV

6.2.1 Extracción de ARN total de hojas de chalote

- TRIzol®Invitrogen
- Etanol 70%
- Isopropanol 99,5% (Sigma)
- Nitrógeno líquido
- Cloroformo 99,8% (Sigma)
- Agua desmineralizada tratada con DEPC (Invitrogen)
- Centrífuga Eppendorf 5415D
- Balanza analítica Sartorius LA 230 S

6.2.2 Cuantificación y visualización de bandas de ARN total

- NanoDrop Thermo scientific 1000
- Agarosa 2% (SeaKem)
- TBE 10X (108g/L Tris, 55g/L ácido bórico, 7,49g/L EDTA)
- SYBR safe (10.000X, Invitrogen)
- Blue Juice 10X (Invitrogen)
- Ladder de 100 bp (Axygen)
- Cámara de electroforesis horizontal Scientific Co. MGU-502T
- Fuente de poder Scientific Co. EPS-300 II C.B.S
- Fotodocumentador (Molecular Imager: BIO-RAD; Gel Doc XR)

6.2.3 Síntesis de la primera hebra de ADNc viral

- ARN total extraído de hojas de chalote (100ng.L^{-1})
- $0,2\text{ }\mu\text{M}$ de cada primer reverse correspondiente (Tabla 1)
- SuperScript III (Invitrogen)
- 5X First-Strand Buffer (Invitrogen)
- Ditioneitol DTT (Invitrogen)
- Termociclador T personal 6138 (Biometra)

6.2.4 Amplificación de ADN viral mediante PCR

- ADNc viral obtenido por transcripción inversa (ver sección 7.1.2)
- 10X PCR Amplification Buffer (Invitrogen)
- $1,5\text{ mM}$ de MgCl_2 (Invitrogen)
- $200\text{ }\mu\text{M}$ de dNTPs (Invitrogen)
- $0,2\text{ }\mu\text{M}$ de cada par de primers correspondiente (Tabla 1)

- DNA Taq polimerasa (Invitrogen)
- Termociclador T personal 6138

6.2.5 Electroforesis en gel de agarosa

- Agarosa 0,8% (SeaKem)
- TBE 10X (108g/L Tris, 55g/L ácido bórico, 7,49g/L EDTA)
- SYBR safe (10.000X, Invitrogen)
- Blue Juice 10X (Invitrogen)
- Ladder de 100 bp (Axygen)
- Cámara de electroforesis horizontal Scientific Co. MGU-502T
- Fuente de poder Scientific Co. EPS-300 II C.B.S
- Fotodocumentador (Molecular Imager: BIO-RAD; Gel Doc XR)

6.3 Cultivo in-vitro de chalote

6.3.1 Desinfección e introducción in-vitro de bulbos de chalote

- Hipoclorito de sodio 2,5%; 3,5%; 4,5%
- Etanol 70%
- Tween 20 (Sigma)
- Agua destilada estéril
- Cámara de flujo laminar (LABCONCO Purifier Clean Bench)

6.3.2 Limpieza de virus SLV y OYDV por medio cultivo de meristema apical y quimioterapia

- Frascos de vidrio de 477mL
- Tubos de ensayo de vidrio de 50mL

- Medio MS (Murashige & Skoog, 1962) pH 5,8.
- Ácido naftalénacético - NAA (Sigma)
- 6-Benzylaminopurina – BA (Sigma)
- Kinetina (Sigma)
- Ácido jasmónico (Sigma)
- Ribavirina (Sigma)
- Benomyl (Agripac)
- Agar (Sigma)
- Sacarosa (marca comercial: San Carlos)
- Carbón activado (Sigma)
- Microscopio de disección Thermo scientific

6.3.3 Aclimatación de plántulas in-vitro de chalote

- Vasos plásticos 355mL
- Sunshine All Purpose Planting Mix (80% Turba + 20% Perlita) (Sun Gro Horticulture)
- Tierra (Agro Terra Potting Mix – Canterbury Research S.A.)
- Agua destilada estéril
- Vasijas de barro

7 Metodología

7.1 Identificación de los virus SLV y OYDV

7.1.1 Extracción de ARN total de hojas de chalote

Se trituró en mortero 100 mg de hojas frescas de plantas de chalote usando nitrógeno líquido; el polvo resultante se mezcló con 1ml de TRIzol y se dejó reposar por 20 min. Se centrifugó a 12000 rpm a 4°C por 15 min. Se rescató la fase líquida, y se agregó 240 uL de cloroformo 99,8%, se dejó reposar por 3 min y se centrifugó bajo las mismas condiciones anteriores. Se colocó el sobrenadante transparente en un nuevo tubo con 500 uL de isopropanol 99,5%, se dejó reposar por 10 min y se centrifugó por 10 min a 12000 rpm a 4°C. Se descartó toda la fase líquida, se lavó el pellet resultante con 1 mL de etanol al 70% y se centrifugó a 7500 rpm por 5 min. Se retiró todo el etanol remanente y se dejó secar el pellet en la cámara de flujo laminar. Se resuspendió el pellet de ARN en 50 uL de agua tratada con DEPC y se almacenó a -70°C. Se midió la concentración de ARN usando el NanoDrop Thermo scientific 1000 y se visualizó las bandas de ARN usando electroforesis en gel de agarosa 2% a 80V por 60 min. Finalmente, se diluyó el ARN obtenido a 100 ng.L⁻¹, y se almacenó a -20°C hasta su uso.

7.1.2 Síntesis de la primera hebra de ADNc viral

Se usó primers específicos para cada virus (Tabla 1). Los primers para SLV fueron descritos por Majumber *et al.* (2008), mientras que, los primers para OYDV fueron descritos por Mahmoud *et al.* (2007). La síntesis de la primera hebra de ADNc viral se realizó de manera independiente para cada uno de los virus.

La reacción para cada virus tuvo un volumen final de 20 uL con 0,2 uM del primer reverse del virus correspondiente (Tabla 1), 5 ug.uL⁻¹ de ARN total (ver sección 7.1.1), 20U de retrotranscriptasa M-MuLV (SuperScript III, Invitrogen), 0,5 uML de dNTP mix, 1X de First-Strand Buffer y 10 mM de DTT. Se realizó una denaturación inicial a 65°C por 5 min, sin la adición de la retrotranscriptasa. Al finalizar este paso, se adicionó la retrotranscriptasa y se incubó por 1 h en el termociclador a 48°C, luego de lo cual se inactivó la enzima calentando la mezcla a 70°C por 15 min. Una vez concluida la reacción, se almacenó a -20°C hasta su uso.

7.1.3 Amplificación y visualización de bandas de ADN viral obtenido

La reacción de amplificación se hizo en un volumen final de 10 uL que contenía 1uL del producto de la retrotranscripción (ver sección 7.1.2) como templado, 1X de PCR Amplification Buffer, 0,2 uM de dNTP mix, 1,5 mM de MgCl, 0,2 uM de cada primer del virus correspondiente (Tabla 1) y 1U de Taq DNA Polimerasa (Invitrogen). Los tiempos de ciclado para los primers SLV fueron: 5 min a 94°C, luego 30 ciclos de 45s a 94°C, 20s a 48°C y 1 min a 72°C, extensión final de 10min a 72°C. Para los primers OYDV el ciclado fue: 10 min a 95°C, después 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 61°C y 1 min a 72°C, extensión final 5 min a 72°C. Los productos de la amplificación se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8% y tinción con SyberSafe®. Finalmente se fotografió el gel usando un transiluminador UV con un software para captura de imagen (Biorad XR documentation system).

7.2 Cultivo in-vitro de chalote

7.2.1 Tratamiento de frío de los bulbos de chalote previo al cultivo in-vitro

Todos bulbos de chalote colectados se sometieron a un proceso de secado inicial. Este proceso consiste en colocar los bulbos en estanterías de madera bajo condiciones ambientales, temperatura máxima de 25°C y mínima de 8°C, por 30 días. Al finalizar este periodo las capas externas se deshidratan, con lo que se evita la proliferación de hongos. Luego del secado, los bulbos fueron almacenados por cuatro semanas en el cuarto frío (4°C) de la Planta Piloto del Colegio de Agricultura, Alimentos y Nutrición (CAAN) de la Universidad San Francisco de Quito en Cumbayá. Este tratamiento prepara a los meristemas para la brotación cuando se los coloca en el medio de cultivo (Fletcher *et al.*, 1998)

7.2.2 Desinfección e introducción in-vitro de bulbos de chalote

Luego de transcurrido el tratamiento en frío, se lavó los bulbos con agua corriente por 10 minutos para retirar restos de tierra y se descartó las capas secas del bulbo. Luego se procedió a cortar en bulbo como se indica en el esquema de la Figura 1. El explante resultante se colocó en etanol 70% por 10 min, luego se probó tres concentraciones de NaClO 2,5%, 3,5% y 4,5% con tres gotas de Tween 20 por diferentes tiempos 20 min, 25 min y 30 min. Luego se los lavó con agua destilada estéril, y se retiró de dos a tres catáfilos externos hasta obtener un explante de 1,5 cm de diámetro y 1 cm de altura. Se colocó cuatro explantes por frasco de vidrio con 50 mL de medio de inducción A MI-A (medio MS + NAA 5uM, BA 5uM, sacarosa 30 g.L⁻¹, benomil 1500mg.L⁻¹, agar 6g.L⁻¹) o en el medio de inducción B MI-B (medio MS, suplementado con NAA 5uM, kinetina 10uM, sacarosa 30 g.L⁻¹, benomil 1500mg.L⁻¹, agar 6g.L⁻¹) según el experimento. Para la eliminación de virus por quimioterapia se usó

el medio de inducción C MI-C, que tiene la misma composición del medio MI-A pero suplementado con 50 mg.L⁻¹ de ribavirina.

7.2.3 Cultivo de meristema y regeneración de plántulas de chalote

Luego de una semana en el medio MI-A, MI-B o MI-C, se obtuvo plántulas de 2-3cm de alto. Usando el microscopio de disección se procedió a extraer el meristema apical según el esquema de la Figura 1. Luego que se extrajo el meristema se lo colocó en un tubo con 20mL del medio MI-A, MI-B o MI-C, correspondiente al medio inicial, por cuatro semanas. Luego de este tiempo se pasó las plántulas formadas al medio de crecimiento MC (medio MS, suplementado con sacarosa 30 g.L⁻¹, agar 6g.L⁻¹) por cuatro semanas más, hasta que alcanzaron una altura de 5cm de alto. Una vez que se obtuvo estas plántulas se las colocó en diferentes medios de embudamiento: medio ME-A (MS + sacarosa 120g.L⁻¹, carbón activado 5g.L⁻¹ y agar 6g.L⁻¹). El medio ME-B tuvo la misma composición que ME-A pero con una reducción en la cantidad de sacarosa a 60 g.L⁻¹; y, el medio ME-C (MS + ácido jasmónico 8mg.L⁻¹, sacarosa 60 g.L⁻¹ y agar 6g.L⁻¹). Luego de 4 a 6 semanas las plantas con bulbo de alrededor de 1cm de diámetro pasaron al proceso de aclimatación. Para determinar la eficiencia de la regeneración de plantas libres de virus por medio del cultivo de meristemas y el tratamiento con ribavirina, se realizó la detección de la presencia de virus mediante RT-PCR (ver sección 7.1) antes de la fase de aclimatación.

7.2.4 Aclimatación de plántulas de chalote

Se utilizó dos métodos de aclimatación. En el primero, aclimatación directa, se colocó las plántulas en los vasos plásticos con Sunshine All Purpose Planting Mix previamente esterilizado (15min, 121°C, 15PSI) y se las regó con agua destilada estéril dos veces por semana. En el segundo, la aclimatación por pasos, se colocó Sunshine All

Purpose Planting Mix en la vasija de barro dentro del frasco de vidrio y se esterilizó (15min, 121°C, 15PSI). Luego, se colocó la planta dentro de la vasija y se cubrió el frasco de vidrio con papel plástico, se regó dos veces por semana y se realizó un agujero de aproximadamente 0,5cm de diámetro cada semana por cuatro semanas. Al finalizar este periodo se pasó las plantas a masetas de plástico con tierra (Agro Terra Potting Mix) y se las colocó en el invernadero del Laboratorio de Biotecnología Vegetal.

8 Resultados

8.1 Identificación de SLV y OYDV

8.1.1 Extracción de ARN total de hojas de chalote

Se recolectó hojas de 55 plantas de chalote que presentaban sintomatología de infección de SLV y OYDV y se extrajo el ARN total de todas ellas. Se logró obtener una alta concentración de ARN en todas las muestras ($620,0 \pm 492,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Sin embargo, la variación en la concentración de ARN es muy alta con muestras que van desde 3451,2 a $108,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$. El índice de absorbancia 260nm/280nm fue $1,54 \pm 0,3$; mientras que el índice 260nm/230nm fue de $0,67 \pm 0,2$ (Anexo 1). Al analizar las muestras en los geles de agarosa se pueden ver las bandas de las subunidades ribosomales (28s y 18s) lo que indica que el proceso de extracción de ARN fue adecuado (Figura 2). Por esto se pudo usar las 55 muestras en los siguientes pasos.

8.1.2 Síntesis de ADNc viral, amplificación de ADN viral y visualización de bandas obtenidas para cada virus

El ARN obtenido fue diluido a una concentración de $100 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ y se usó como molde para la síntesis de ADNc, usando la enzima SuperScript III (Invitrogen). De la misma manera el ADNc obtenido fue usado como molde para el PCR sin dilución

previa. Luego de la amplificación se visualizó las bandas por medio de electroforesis en geles de agarosa. Se observó en todas las muestras una banda en 308bp para SLV (Figura3) y en 601bp para OYVD (Figura 4) que corresponde a los tamaños de banda esperados respectivamente (Majumber *et al.*, 2008; Mahmoud *et al.*, 2007). Estos datos comprueban el 100% de infección de los dos virus para las 55 muestras de plantas de chalote analizadas.

8.2 Cultivo in-vitro de chalote

8.2.1 Desinfección e introducción in-vitro de bulbos de chalote

Se analizó la efectividad de tres concentraciones de hipoclorito de sodio (2,5%; 3,5%; 4,5%) en tres tiempos diferentes (20 min, 25 min, 30 min) usando ocho bulbos de chalote por tratamiento. Se cortó los bulbos según el esquema descrito en la Figura 1, y se sembró los discos basales en el medio MI-A por una semana. Se logró determinar que en la concentración más baja de hipoclorito de sodio (2,5%), sin importar el tiempo de exposición, se obtuvo un 100% de contaminación, mientras que en la concentración más alta (4,5%) se logró 0% de contaminación a partir de 30 min (Tabla 2). Para todos los experimentos posteriores se utilizó el protocolo de desinfección usando hipoclorito de sodio al 4,5% por 30 min.

Los resultados anteriores se obtuvieron luego de suplementar los medios MI-A, MI-B y MI-C con el fungicida sistémico benomil. Cuando no se colocaba el fungicida se obtenía un 100% de contaminación por *Pyrenochaeta terrestris*, un hongo endógeno agente etiológico de la raíz rosada. Sin importar la concentración del hipoclorito de sodio o del tiempo de exposición no se logró eliminar al hongo. Esto se debe a que las hifas de este hongo penetran en la epidermis y el tejido cortical de las raíces y del bulbo (Cadenas y Mattos, 2001).

8.2.2 Cultivo de meristemas de chalote, regeneración de plántulas y aclimatación

8.2.2.1 Análisis del número de catáfilos en el explante inicial para el cultivo de meristemas

Se analizó el número de catáfilos presentes en explante para el inicio de la regeneración de los meristemas. Para esto se aisló meristemas con uno, dos y tres catáfilos, y se los colocó en el medio MI-A por cuatro semanas. Se utilizó 15 explantes por tratamiento. Se encontró 0% de regeneración para explantes con un catáfilo, 73% para explantes con dos, y 100% para explantes con tres. Para todos los experimentos posteriores se utilizó explantes con dos catáfilos, ya que son los explantes más pequeños con los que se obtuvo regeneración de plántulas a partir del meristema.

8.2.2.2 Comparación entre reguladores de crecimiento

Se usó los medios MI-A + 5 uM BA y el medio MI-B + 10 uM kinetina. Se usó 30 discos basales por tratamiento y se siguió el protocolo estándar de siembra y extracción de meristemas (Figura 1). Luego de cuatro semanas en el respectivo medio se registró los datos y se encontró un 33% de crecimiento de plántulas en el medio MI-A y un 53% de crecimiento en el medio MI-B.

8.2.2.3 Comparación de crecimiento entre familias seleccionadas de chalote

Se usó 30 bulbos de la familia 11S03 y 30 bulbos de la familia 11S04. Ambas familias fueron establecidas a partir de plantas individuales cosechadas en enero de 2011 en la Granja Experimental de la USFQ. Se siguió el procedimiento ya establecido de siembra de discos basales y extracción de meristemas (Figura 1). Se utilizó el medio MI-B y los datos se registraron luego de cuatro semanas. La familia 11S03 tuvo un 43% de regeneración de plántulas a partir del meristema y la 11S04 un 73%.

8.2.2.4 Formación de bulbos a partir de plántulas de chalote obtenidas por cultivo de meristemas

Para estos experimentos se usó plántulas obtenidas a partir de meristemas sembrados en el medio MI-A por cuatro semanas y que luego fueron transferidas al medio MC por cuatro semanas más. En el medio ME-A se colocó 10 plántulas pero no se obtuvo la formación de ningún bulbo ya que luego de una semana todas las plántulas presentaron señales de envejecimiento y para la segunda semana se encontraban secas. Debido a esto se redujo la concentración de azúcar en el medio a la mitad (de 120 g.L^{-1} a 60 g.L^{-1}). En el medio ME-B se colocó 18 plántulas de las cuales 11 formaron bulbo (61%) luego de 6 semanas, pero solo 4 plántulas desarrollaron raíces (22%). Finalmente todas las plantas con bulbo fueron llevadas al proceso de aclimatación. Para mejorar el porcentaje de embulbamiento se suplementó el medio ME-B con 8 mg.L^{-1} de ácido jasmónico (medio ME-C), se transfirió 8 plántulas de las cuales el 88% desarrolló bulbo a las 4 semanas pero no se vio la formación de nuevas hojas o raíces. A las 5 semanas el 100% de las plántulas se secaron.

8.2.2.5 Aclimatación de bulbos obtenidos por cultivo in-vitro de meristemas

Se utilizó los bulbos obtenidos en el medio ME-B, los cuales se dividieron para la prueba de aclimatación directa o por pasos. Se colocó 6 plantas para aclimatación directa, las cuales luego de 2 semanas presentaron señales de desecación. Las 5 plantas restantes pasaron por el proceso de aclimatación por pasos, de estas: una planta presentó contaminación por hongos, y las cuatro restantes se secaron luego de dos semanas. No se obtuvo la aclimatación efectiva de ninguna plántula.

8.3 Eficiencia en la regeneración de plantas de chalote libres de SLV y OYDV

Se utilizó un total de 120 bulbos infectados con los dos virus, SLV y OYDV, que fueron previamente diagnosticados por el método molecular antes descrito. Se los dividió en tres grupos de 40 bulbos, de los cuales 20 se usaron como control y 20 como tratamiento; con esto se tuvo un total de tres repeticiones independientes. El tratamiento consistió en el cultivo de meristemas en el medio MI-C, que se halla suplementado con ribavirina; mientras que, para el control se cultivó los meristemas en el medio MI-A, sin ribavirina. Se aplicó el protocolo ya establecido para la extracción de meristema (Figura 1). Luego de 4 semanas en el medio correspondiente, las plántulas obtenidas se pasaron al medio MC por cuatro semanas más, y luego al medio ME-B por 6 semanas más. Al terminar este proceso, se cortó 100mg de hoja de las plántulas obtenidas para la detección viral. Finalmente, ninguna planta pudo ser aclimatada.

Los resultados obtenidos muestran que la efectividad promedio para la eliminación de SLV es $29\pm 9\%$ (6 plántulas de 20 totales) en el control y $42\pm 12\%$ (9 plántulas de 20 totales) en el tratamiento; para OYDV es $29\pm 9\%$ (6 plántulas de 20 totales) para el control y $55\pm 15\%$ (11 plántulas de 20 totales) para el tratamiento (Tabla 3). Al realizar la prueba t de Student para muestras independientes en Minitab®15, no se encontró diferencias significativas entre el control y el tratamiento para la eliminación de SLV (Valor T = -1,91; Valor P = 0,152; GL = 3) ni para plantas libres de los dos virus (Valor T = -1,91; Valor P = 0,152; GL = 3), pero si es significativa para la eliminación de OYDV (Valor T = -4,48; Valor P = 0,021; GL = 3).

Aunque, no se logró la aclimatación de ninguna planta, se puede obtener el porcentaje de regeneración desde el cultivo de meristema hasta la formación de plántulas con bulbo, para el control fue $33\pm 8\%$ (20 plántulas regeneradas de 60

meristemas aislados) y para el tratamiento fue $33\pm3\%$ (20 plántulas regeneradas de 60 meristemas aislados) (Tabla 3).

9 Discusión

9.1 Identificación de los virus SLV y OYDV

El protocolo de detección para los virus SLV y OYDV basado en RT-PCR usando primers específicos fue eficiente ya que se logró detectar virus en el 100% de las plantas muestreadas en campo que mostraban síntomas, de esta manera se logró una congruencia tanto en la detección morfológica como en la molecular. Esto ya ha sido encontrado en otros estudios como el de Majumder *et al.* (2008) y Mahmoud *et al.* (2007). En este estudio no se pudo realizar la detección simultánea de los virus usando un PCR multiplex debido a la diferencia entre la temperatura de annealing de los primers, 48°C para SLV y 61°C para OYDV. Esto provocaría que al aumentar la temperatura no se obtenga amplificación con los primers de SLV, o si se reduce la temperatura, los primers de OYDV amplifiquen bandas inespecíficas.

En este estudio, se encontró infección de los dos virus en el 100% de las plantas colectadas en la Granja Experimental de la USFQ. Estas plantas a su vez tienen su origen en la provincia de Chimborazo donde todavía son cultivadas; por lo que se puede inferir que los virus tienen una alta incidencia en dicha provincia. Debido a que los cultivos de cebolla chalote se realizan en campo abierto se facilita la transmisión de OYDV y SLV por medio de áfidos a plantaciones cercanas y a otras especies de *Allium*. La incidencia de estos dos virus en chalote se torna cada vez más marcada porque los bulbos que se usan como semilla para las nuevas siembras se obtienen por medio de propagación vegetativa. Debido a esto, no se tiene material inicial libre de virus, además, que la carga viral va a aumentar con cada ciclo de cultivo (Salomon, 2002).

9.2 Cultivo in-vitro de plántulas de chalote

9.2.1 Desinfección e introducción in-vitro de bulbos de chalote

Para lograr la introducción in-vitro de la cebolla se necesitó una alta concentración de hipoclorito de sodio (4,5%) y un tiempo prolongado de exposición (30 min) (Fletcher *et al.*, 1998). Para solucionar los problemas de contaminación externa se realizó un lavado previo con agua corriente con el cual se eliminaron todos los restos pesados del material vegetal. Es importante señalar que tiempos prolongados bajo la exposición al hipoclorito de sodio pueden causar daños severos en el explante. Por esta razón no se desinfecta de manera directa a los meristemas sino que se desinfecta al bulbo y luego se extrae de manera aséptica los meristemas (Hodayat, 2005).

9.2.2 Extracción de meristemas, regeneración de plántulas y aclimatación

Se logró obtener porcentajes de regeneración entre 30% a 40% desde la extracción del meristema hasta la formación plántulas con bulbo. Sin embargo, las plántulas obtenidas presentaron síntomas de senescencia temprana. Los síntomas observados fueron desecación de las hojas y deterioro en el sistema radicular, por lo que no se logró la aclimatación de ninguna plántula. En un trabajo realizado por Ramírez-Malagón *et al.* (2006) se logró un 41,7% de regeneración de plantas a partir del cultivo de meristemas de ajo. En el estudio citado previamente no se reportan problemas de senescencia temprana, y se llega a aclimatar todas las plántulas obtenidas.

Se logró una mejora en el porcentaje de formación de plántulas cuando se usó diferentes reguladores de crecimiento. Se logró un aumento del 33% al 56% cuando se probó 10uM kinetina + 5uM NAA en lugar de 5uM BA + 5uM NAA. En el estudio realizado por Rancillac y Teyssendier (1992) se probó que mayores concentraciones de

citoquininas en comparación a las auxinas permitían una mejor regeneración, pero cuando la concentración de cualquiera de las dos era muy elevada se presentan efectos tóxicos sobre la planta provocando senescencia y crecimiento lento. El mismo efecto, también, se producía cuando no se alternaba a las plántulas entre medios con reguladores de crecimiento y sin reguladores (Rancillac y Teyssendier, 1992). La reducción del tiempo cultivo en el medio de inducción con hormonas (MI-A, MI-B y MI-C) antes de pasarlas al medio de crecimiento sin hormonas (MC) puede ser una opción para evitar efectos tóxicos en las plántulas. En futuros estudios se debería reducir al máximo posible el tiempo de permanencia en medio de inducción y pasar las plántulas antes de las 4 semanas al medio de crecimiento. Con esto se busca evitar el apareamiento de senescencia temprana que produce desecación y reducción en el potencial de crecimiento de las plántulas en los medios de crecimiento y embulbamiento. Finalmente, estos síntomas generan problemas al momento de la aclimatación.

Para la formación de bulbos se recomienda el uso de carbón activado y altas concentraciones de azúcar (Mohamed-Yasseen *et al.*, 1995). Cuando se usó 120mg.L⁻¹ de sacarosa en el medio se marchitaron las plantas. Esto se pudo deber al choque osmótico producido, ya que cuando se redujo la concentración a la mitad se logró un 61% de formación de bulbo. Al adicionar ácido jasmonico en el medio se logró un mayor porcentaje de embulbamiento (88%), sin embargo, se vio efectos deletéreos en las plántulas que finalmente se secaron.

Se debe considerar que el material vegetal utilizado en las pruebas iniciales tenía gran variabilidad genotípica, ya que no se trabajó con una sola variedad o un solo cultivar. Las plantas colectadas para este estudio, inicialmente provinieron de distintas poblaciones de chalotes colectadas en la provincia de Chimborazo, las cuales fueron

posteriormente cultivadas en la Granja Experimental de la USFQ como un parte de un programa de mejora genética. Como consecuencia, no se pudo obtener material vegetal uniforme a lo largo del estudio. La variabilidad en el material inicial utilizado en cada experimento dificulta la extrapolación de resultados y como consecuencia la optimización de un protocolo.

Esto se vio reflejado en el ensayo en el que se trabaja con dos familias de cebolla, las cuales aún no se consideran como variedades, pero que muestran una variabilidad genotípica más reducida al provenir de una sola planta inicial que paso por varios ciclos de propagación vegetativa. Los resultados obtenidos indican que la familia 11S03 tuvo un 43% de regeneración, mientras que la 11S04 tiene un 73%, cuando se usó el mismo medio de inducción (MI-B) para el cultivo de meristemas. Resultados similares fueron reportados por Rodríguez *et al.* (1996) para dos variedades de cebolla de día corto, ‘Pira ouro’ y ‘Pirana precoce’. La variedad ‘Pirana precoce’ respondía de mejor manera al aumento de BA de 2mg.L^{-1} a 4mg.L^{-1} en el medio de cultivo con lo que se conseguía un aumento de regeneración de 33,4% a 66,7%, mientras que para la variedad ‘Pira ouro’ este aumento en BA significaba una reducción del 43,8% al 37,5%. El mismo comportamiento se vio en otras características como la formación de raíces y bulbo.

En este estudio se probaron dos métodos de aclimatación pero en ninguno de los dos se obtuvo resultados positivos. Con el método de aclimatación directa no se logró el crecimiento de ninguna de las plántulas. Al realizar aclimatación directa, se produce una reducción rápida de la humedad relativa. Esto no permite una adaptación paulatina de la plántula a las nuevas condiciones, lo que puede provocar que la planta se marchite por desecación. A pesar de esto, es el método más utilizado cuando se trabaja con cebolla (Mohamed-Yanseem *et al.*, 1995). Para evitar este problema se utilizó un método de

aclimatación por pasos, con la cual la reducción de la humedad relativa se lo hace de manera progresiva para evitar la aparición de desecación. No obstante, por este método el resultado fue el mismo con el anterior. Estos resultados se pueden atribuir a que las plántulas tenían un sistema radicular deficiente y mostraban signos de desecación. Los síntomas descritos se presentaron en todas las plántulas regeneradas a lo largo de todo el estudio y son consistentes con el apareamiento de senescencia temprana (Edwards *et al.*, 2012; Rancillac y Teyssendier, 1992).

9.2.3 Senescencia temprana en el cultivo de meristemas de chalote

A lo largo del estudio se pudo observar que las plántulas desarrolladas a partir de meristemas presentaron los síntomas descritos por Rancillac y Teyssendier (1992) para senescencia temprana como desecación de las hojas, deterioro del sistema radicular y crecimiento lento. La senescencia ocurre al final del ciclo de vida de las plantas anuales cuando han alcanzado su madurez. Consiste en un conjunto de cambios en la expresión génica para detener el crecimiento e iniciar un proceso de muerte celular programada. La senescencia temprana implica el inicio de todos estos procesos de manera acelerada (Edwards *et al.*, 2012). Por lo que se puede considerar que este fue uno de los factores por lo que la tasa de regeneración de plántulas con bulbo a partir de meristemas no pudo ser mayor al 33% y no se logró completar el proceso de aclimatación de las mismas de manera exitosa.

En un estudio realizado por Rancillac y Teyssendier (1992) muestra que el problema de senescencia temprana en el cultivo in-vitro se produce por una dominancia apical prolongada a lo largo de los pasos por los diferentes medios y que es independiente al regulador de crecimiento que se utilice. Para destruir la dominancia apical en cada ciclo de propagación se corta el explante en cuatro partes para inactivar

al meristema apical y activar tejidos axilares que pueden formar nuevas plántulas. Las mismas que presentan mayor capacidad de regeneración y no presentan signos de envejecimiento a lo largo de todo el proceso. Por eso se propone como solución la rotura de la dominancia apical luego de la formación de bulbo para la formación de nuevas plántulas que puedan ser aclimatadas, luego de que se cumpla nuevamente el ciclo de regeneración, como se muestra en el esquema de la Figura 5.

9.3 Eficiencia en la regeneración de plantas libres de SLV y OYDV

Se logró un 29% de plantas libres de SLV y OYDV cuando se usó cultivo de meristemas, este porcentaje se mejoró cuando se lo combinó con quimioterapia, 42% de plantas libres de SLV y 55% de plantas libres de OYDV. Estos resultados son menores a los obtenidos por Fletcher *et al.* (1998) quienes lograron 62% de plantas libres de OYDV y SLV utilizando el mismo método. Una de las principales variables se halla en el corte del meristema, ya que mientras mayor sea la cantidad de tejido adulto se deje junto al meristema, mayor será probabilidad de contaminación viral. Sin embargo, se ha demostrado que cuando se extrae el meristema con muy poca cantidad de tejido acompañante no se produce regeneración (Rancillac y Teyssendier, 1992). Esto se pudo constatar cuando se analizó el número de catáfilos en el explante inicial para el cultivo de meristemas. En este experimento se encontró que meristemas acompañados de un catáfilo no regeneraban, mientras que cuando se dejaba tres catáfilos se obtenía un 100% de regeneración de plántulas. Por lo tanto, es muy importante lograr el explante más pequeño posible para que se reduzca la posibilidad de contaminación viral pero que sea lo suficientemente grande para que logre regeneración de plántulas a partir del meristema.

En este estudio se logró establecer un protocolo eficiente de detección molecular de los virus SLV y OYDV en chalote. Usando este protocolo se determinó un 100% de infección de los dos virus en el material vegetal colectado. También, se utilizó para determinar la presencia de los mismos virus en las plántulas obtenidas luego del cultivo de meristemas y la quimioterapia. Con el cultivo de meristemas se logró un 29% de plántulas libres de los dos virus, que al ser combinado con quimioterapia, se mejoró este porcentaje a 40%. Uno de los principales problemas encontrados fue la baja tasa de regeneración de plántulas a partir de meristemas (33%). Esto está relacionado al apareamiento de senescencia temprana que provoca desecación en las hojas, formación de un sistema radicular deficiente y reducción en la tasa de crecimiento. Para evitar este problema se propone la ruptura de la dominancia apical a lo largo del ciclo de cultivo in-vitro. De esta manera, se espera que las nuevas plántulas no presenten los síntomas relacionados a senescencia temprana. Por otro lado, al evitar el apareamiento de senescencia temprana se espera aclimatar las plántulas obtenidas de manera exitosa.

10 Conclusiones

- Se estableció un protocolo de detección para SLV y OYDV basado en RT-PCR usando primers específicos.
- Se encontró infección de los dos virus en todas las plantas colectadas.
- Se necesita dejar al menos dos catáfilos junto al meristema para que se pueda lograr regeneración de plántulas de chalote.
- El medio MI-B (MS + NAA 5uM, kinetina 10uM, sacarosa 30g.L⁻¹, benomyl 1500mg.L⁻¹ y agar 6g.L⁻¹) fue el más eficiente para la inducción del crecimiento del meristema.
- El medio ME-B (MS + sacarosa 60g.L⁻¹, carbón activado 5g.L⁻¹ y agar 6g.L⁻¹) fue el más eficaz para la formación de bulbo, sin producir desecación de las plántulas.
- Se logró obtener plántulas libres de virus por medio del cultivo de meristemas, aunque con un porcentaje bajo (29%).
- Con el uso de ribavirina se mejoró el porcentaje de limpieza de virus a 44%.
- El porcentaje de regeneración de plántulas a partir del cultivo meristemas no se vio afectado por la ribavirina.
- No se logró aclimatación de plantas.

11 Recomendaciones

- Para agilizar la detección de los virus se puede realizar RT-PCR multiplex en el que se identifique a OYDV y SLV en una reacción.
- En el diseño de nuevos experimentos se debería incluir análisis estadístico para identificar diferencias significativas en cada experimento. Esto facilitaría la estandarización de un protocolo de regeneración de plántulas a partir de cultivo de meristemas.
- Utilizar una sola variedad de chalote a lo largo de todos los experimentos para facilitar la extrapolación de resultados.
- Reducir el tiempo de los explantes en los medios con reguladores de crecimiento para evitar efectos tóxicos.
- Romper la dominancia apical para evitar la senescencia temprana de las plantas, con lo que se mejorara el porcentaje de regeneración y se facilitará el proceso de aclimatación.
- Aumentar la concentración de rivabirina en el medio para mejorar el porcentaje de limpieza de virus.

12 Bibliografia

- Arifin, N.; Ozaki, Y.; Okubo, H. (2000) *Genetic diversity in Indonesian chalote (Allium cepa var. ascalonicum) and Allium wakegi revealed by RAPD markers and origin of A. wakegi identified by RFLP analyses of amplified chloroplast genes*. Kluwer Academic Publisher. Holanda. Euphytica 111: 23–31
- Bagi, F.; Stojšin, V.; Budakov, D.; Moh, S.; El Swaeh, A.; Gvozdanović-Varga, J. (2012) *Effect of onion yellow dwarf virus (OYDV) on yield components of fall garlic (Allium sativum L.) in Serbia*. African Journal of Agricultural Research Vol. 7(15), pp. 2386-2390
- Bos, L.; Huttinga, H.; Maat, D. (1978) *Shallot latent virus, a new carlavirus*. Netherlands Journal of Plant Pathology Volume 84, Issue 6, pp 227-237.
- Cadenas, C.; Mattos, L. (2001) *Etiología de la raiz rosada de la cebolla y su control químico*. Anales Científicos UNALM pp 189-199
- Caldes, G.; Prescott, B. (1973) *A potencial antileukemic substace present in Allium ascalonicum*. PlantaMedica 23, 99-100
- Conci, V.; Canavelli, A.; Lunello, P. (2003) *Yield Losses Associated with Virus-Infected Garlic Plants During Five Successive Years*. Plant Dis. 87:1411-1415.
- Currah, L.; Proctor, F. (1990) *Onions in Tropical Regions*. Bulletin 35, Natural REsources Institute, Chatham MAritime, Kent, UK 232.
- Dankert, J.; Tromp, T.; de Vires, H.; Klasen, H. (1979) *Antimicrobial activity of crude juices of Allium ascalonicum, Allium cepa and Allium sativum*. Zentralblatt fur Bakteriologie, Paraxitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene 245, 229-239.
- Diekmann, M. Ed. (1997) *Allium spp*. FAO/IPGRI Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm No. 18.
- Di Laurenzio L.; Wysocka-Diller J.; Malamy JE.; Pysh L.; Helariutta Y.; Freshour G.; Hahn MG.; Feldmann KA.; Benfey PN. (1996) *The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the Arabidopsis root*. Cell: 86(3):423-33.

- Edwards, K.; Humphry, M.; Sanchez-Tamburrino, J. (2012) *Advances in Plant Senescence*. Senescence: 117-136.
- Elnagar, S.; El-Sheik, M.; Abdel Wahab, (2009) *Effect of natural infection with onion yellow dwarf virus (OYDV) on yield of onion and garlic crops in Egypt*. 4th Conference on Recent Technologies in Agriculture: 34-39
- Fletcher, P.; Fletcher, J.; Lewthwaite, S. (1998) *In vitro elimination of onion yellow dwarf and shallot latent viruses in shallots (Allium cepa var. ascalonicum L.)*, New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, Vol. 26: 23-26.
- Fritsch, R.; Friesen, N. (2002) *Evolution, Domestication and Taxonomy*. Allium Crop Science: Recent Advances. First edition.CABI.
- Galmarini, C. (1997) *Allium crop situation in Argentina*.ActaHorticulturae 433. 35-52.
- Grubben, G. (1994) *Constraints for chalone, garlic and welsh onion in Indonesia: a case study on the evolution of allium crops in the equatorial tropics*. Acta Horticulturae 358, 333-339.
- Jones, H.; Mann, L. (1963) *Onions and their allies*.Botany, cultivation, and utilization.Interscience Publishers, New York, 286.
- Kassachau, K.; Xie, Z.; Allen, E.; Llave, C.; Chapman, E.; Krizan, K.; Carrington, C. (2003) *P1/HC-Pro, a Viral Suppressor of RNA Silencing, Interferes with Arabidopsis Development and miRNA Function*. Developmental Cell: 4, 205–217.
- Lapitan, V. Pateña, L. Rosario, T.*In vitro system of producing chalone planting material.Philippines*. Journal of Crop Science 16(3), 95-101. 1991
- Lot, H.; Chovelon, V.; Souche, S.; Delecolle, B. (1998) *Effects of Onion Yellow Dwarf and Leek Yellow Stripe Viruses on Symptomatology and Yield Loss of Three French Garlic Cultivars*. The American Phytopathological Society. Plant Disease: 1381-1395
- Mahmoud, S.; Maaty, S.; Abdel-Ghaffar, M. (2007) *Identification of Onion Yellow Dwarf Potyvirus as one of the Major Viruses Infecting Garlic in Egypt*, American Euroasian Journal of Agriculture and Environment, Vol. 6: 746-755.

- Majumder, S.; Baranwal, V.; Joshi, S. (2008) *Simultaneous Detection of Onion Yellow Dwarf Virus and Chalote Latent Virus in infected leaves and cloves of Garlic by Duplex RT-PCR*. India, Journal of Plant Pathology, Vol. 90, 371-374.
- Messiaen, C.; Lot, H.; Delecolle, B. (1994) *Thirty years of France's experience in the production of disease-free garlic and shallot mother bulbs*. ActaHorticulturae 358, 275-279.
- Mohamed-Yasseen, Y.; Barringer, S.; Splittsotoesser, W. (1995) *In vitro bulb production from Allium spp.* In Vitro Cell. Dev. Biol. 31:51-52. 1995
- Mituti, T.; Marubayashi, J.; Moura, M.; Krause-Sakaye, R.; Pavan, M. (2011) *First Report of Chalote latent virus in Garlic in Brazil*. The American Phytopathological Society. Volume 95, Number 2: 227.2.
- Ramírez-Malagón, R.; Pérez-Moreno, L.; Borodanenko A.; Salinas-Gonzalez, G.; Ochoa-Alejo, N. (2006) *Differential organ infection studies, potyvirus elimination, and field performance of virus-free garlic plants produced by tissue culture*. Plant Cell Tiss Organ Cult 86:103–110.
- Rancillac, M.; Teyssendier, B. (1992) *Long-term multiplication of onion (Allium cepa L.) by cyclic shoot regeneration in vitro*. France, 1992; Plant Cell and Organ Culture, Vol. 28: 281-288.
- Randle, W.; Lancaster, J. (2002) *Sulphur Compounds in Alliums in relation to flavor quality*. Allium Crop Science: Recent Advances. First edition.CABI.
- Salomon, R. (2002) *Virus Diseases in garlic and the propagation of virus-free plants*. Allium Crop Science: Recent Advances. First edition.CABI, 2002.
- Salomon, R.; Koch, M.; Levy, S.; Gal-On, A. (1996) *Detection and identification of the viruses forming mixed infection in garlic*. Symposium Proceedings No. 65: Diagnostics in Crop Production. Reino Unido pp 193-198.
- Shiboleth, Y.; Gal-On, A.; Koch, M.; Rabinowitch, H.; Salomon, R. (2006) *Molecular characterisation of Onion yellow dwarf virus (OYDV) infecting garlic (Allium sativum L.) in Israel: Thermo-therapy inhibits virus elimination by meristem tip culture*. Annals of Applied Biology, 138: 187–195. 2006

- SINAGAP (Sistema de Información Nacional de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca). Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca del Ecuador. [consultado: 03/03/2013] <<http://servicios.agricultura.gob.ec/sinagap/>>
- Stearn, W. *How many species of Allium are known?*. Curti's Botanical Magazine 9: 180-182. 1992
- Takaki, F.; Sano, T.; Yamashita, K. (2006) *The complete nucleotide sequence of attenuated onion yellow dwarf virus: a natural potyvirus deletion mutant lacking the N-terminal 92 amino acids of HC-Pro*. Archives of Virology 151: 1439-1445
- Tappayuthpijarn, P.; Dejatiwongse, Q.; Hincharanan, T.; Suriyant, P. (1989) Effect of *Allium ascalonicum* on erythrocyte shape in induced hypercholesterolemia rabbits. Journal of the Medical Association of Thailand 72, 448-451
- Torrico, A. (2010) *First Report of Chalote latent virus in Garlic in Argentina*. The American Phytopathological Society. Volume 94, Number 7: 915.2
- Ucman, R.; Zel, J.; Ravnikar, M. (1998) Thermotherapy in virus elimination from garlic: influences on shoot multiplication from meristems and bulb formation in vitro. Scientia Horticulturae 73, 193-202
- van Dijk, P. (1993) *Carlavirus isolates from cultivated Allium species represent three viruses*. Netherlands Journal of Plant Pathology 99:233-257.
- Walkey, D. *Virus diseases*. (2002) In: Radinowitch. H.D. and Brewster, J. (eds) Onions and Allied Crops, Vol II. Agronomy, Biotic Interactions, Pathology and Crop Protection. CRC Press, Florida, 191-212

13 Tablas

Tabla 1. Primers usados para la detección de SLV y OYDV

Primer		Secuencia	Temperatura de annealing °C
SLV	Forward	5'GTGGTNTGGAATTAC3'	48
	Reverse	5'CAACATCGATTYTCTC3'	
OYDV	Forward	5'CGAAGCAAATTGCCAAGCAG3'	61
	Reverse	5'CGATTAGCTGCCCCTCTAAC3'	

Se muestra la secuencia del par de primers para cada virus y su temperatura de annealing. Los primers para SLV fueron reportados por Majumder *et al.* (2008), y para OYDV fueron reportados por Mahmoud *et al.* (2007).

Tabla 2. Porcentajes de contaminación obtenidos para diferentes tratamientos de desinfección de bulbos de chalote

Tiempo (min) NaClO (%)	25	30	35
2,5	100%	100%	100%
3,5	100%	88%	63%
4,5	38%	0%	0%

Se muestra los porcentajes de contaminación obtenidos para ocho bulbos por tratamiento para el proceso de desinfección usando diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio y diferentes tiempos de exposición.

Tabla 3. Porcentajes de plantas libres de virus

Repetición		Regeneración	SLV	OYDV	SLV y OYDV
Primera	Tratamiento	6/20 (30%)	2/6 (33%)	3/6 (50%)	2/6 (33%)
	Control	5/20 (25%)	1/5 (20%)	1/5 (20%)	1/5 (20%)
Segunda	Tratamiento	7/20 (35%)	4/7 (57%)	5/7 (71%)	4/7 (57%)
	Control	7/20 (35%)	2/7 (29%)	2/7 (29%)	2/7 (29%)
Tercera	Tratamiento	7/20 (35%)	3/7 (43%)	3/7 (43%)	3/7 (43%)
	Control	8/20 (40%)	3/8 (38%)	3/8 (38%)	3/8 (38%)
% Promedio	Tratamiento	33%	44%	55%	44%
	Control	33%	30%	30%	30%
DE	Tratamiento	3%	12%	15%	12%
	Control	8%	9%	9%	9%

Se muestra los resultados obtenidos para las tres repeticiones para el experimento de limpieza de SLV y OYDV en chalote. Se utilizó un total de 120 bulbos infectados con los dos virus, SLV y OYDV. Control: cultivo de meristema. Tratamiento: cultivo de meristema más quimioterapia. Se presenta el promedio y la desviación estándar (DE) de los porcentajes obtenidos para cada repetición. Se incluye el porcentaje de regeneración encontrado.

14 Figuras

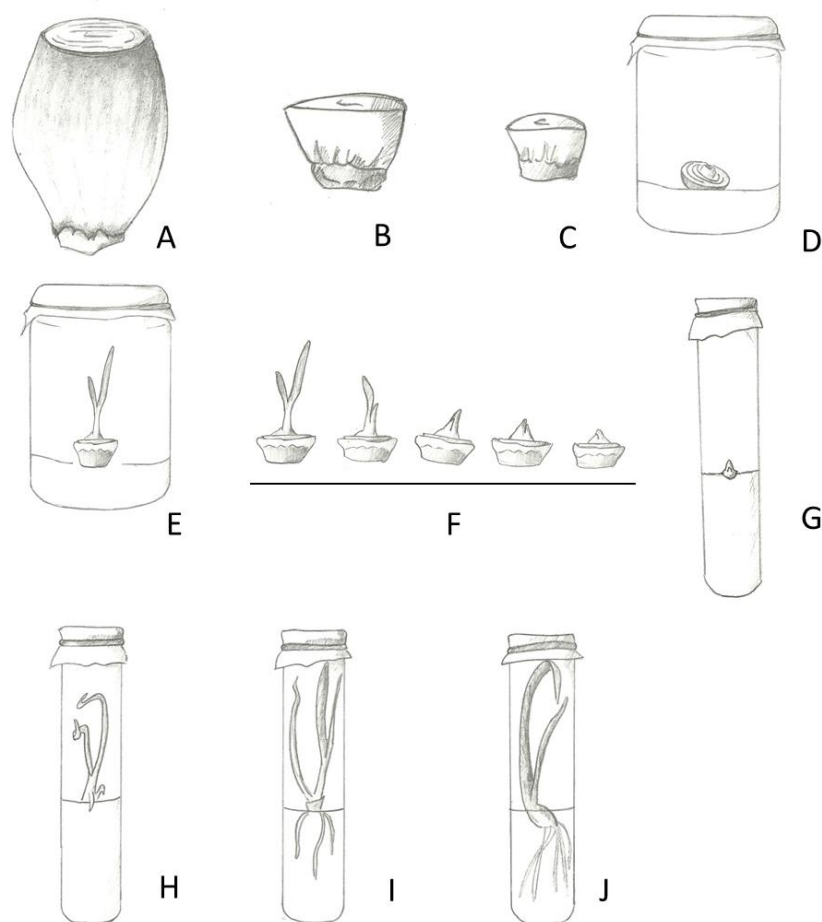


Figura 1. Esquema de regeneración de plántulas de chalote a partir de cultivo de meristemas

A. Bulbo luego de la limpieza con agua corriente y descarte de las capas externas secas. B. Se corta el bulbo a un tercio de su longitud y se lo somete al proceso de desinfección. C. Se retira el tejido dañado por la desinfección hasta obtener un explante de 1,5 cm de diámetro y 1 cm de alto. D. Disco basal en medio de inducción día cero. E. Explante luego de una semana en medio de inducción, listo para extracción de meristema. F. Se eliminan de manera sistemática los catáfilos más externos hasta dejar el disco basal acompañado del meristema apical rodeado de dos catáfilos. G. Se recorta el disco basal hasta dejar milímetros de alto junto al meristema apical, y se lo coloca en el medio de inducción. H. Plántula regenerada en medio de inducción a la semana 4. I. Plántula en medio de crecimiento –sin hormonas- en la cuarta semana, se ve la formación de raíces. J. Plántula en medio de embulbamiento en la sexta semana, se ve la formación de bulbo de alrededor de 1cm de diámetro; esta plántula puede iniciar el proceso de aclimatación.

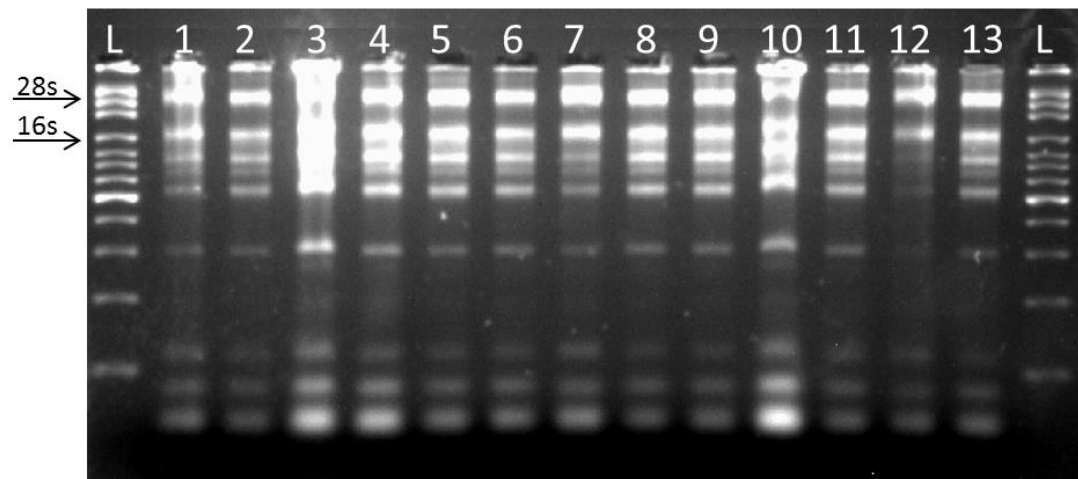


Figura 2. Electroforesis de ARN total

Se muestra los resultados de la electroforesis de ARN total obtenido de 13 muestras de hojas de chalote con el método de extracción indicado. Las flechas indican el tamaño de las subunidades ribosomales 28s y 16s. L: Ladder. 1-13: Muestras de ARN total obtenidos de hojas de plantas de chalote.

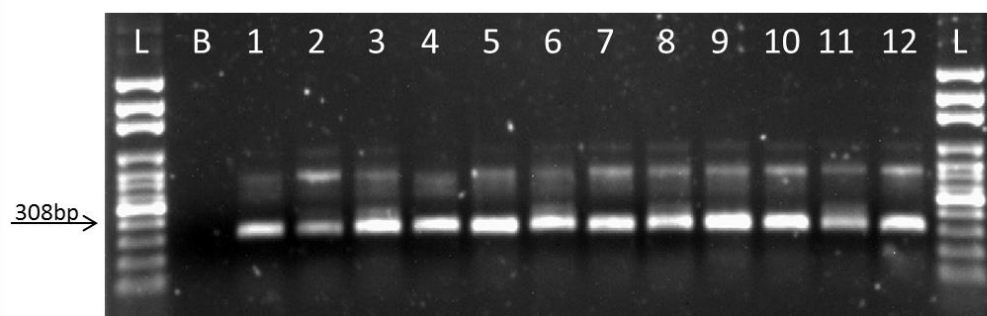


Figura 3. Detección de SLV en plantas de chalote previo al proceso de limpieza de virus

Se muestra los resultados obtenidos para la amplificación de 12 muestras de ADNc del virus SLV obtenido a partir de ARN total extraído de hojas de plantas de chalote. La flecha indica el tamaño de banda esperado. L: Ladder. B: Blanco. 1-12: Muestras de amplificación de ADNc viral.

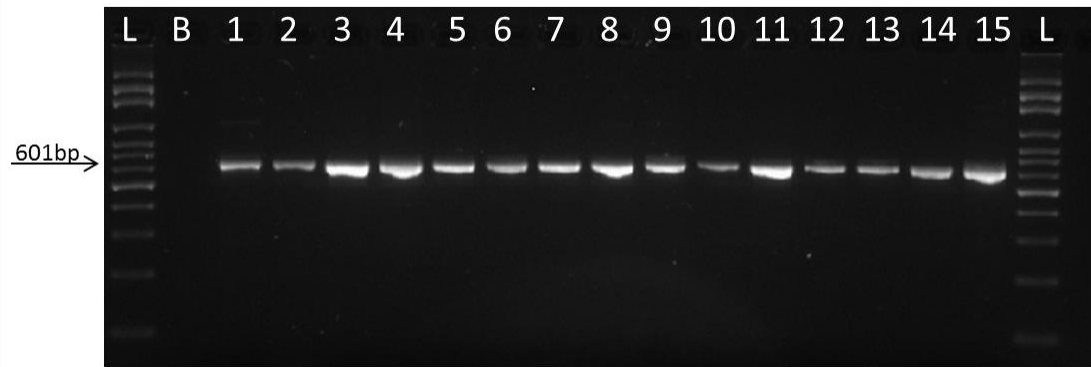


Figura 4. Detección de OYDV en plantas de chalote previo al proceso de limpieza de virus

Se muestra los resultados obtenidos para la amplificación 15 muestras de ADNc del virus OYDV obtenido a partir de ARN total extraído de hojas de plantas de chalote. La flecha indica el tamaño de banda esperado. L: Ladder. B: Blanco. 1-15: Muestras de amplificación de ADNc viral

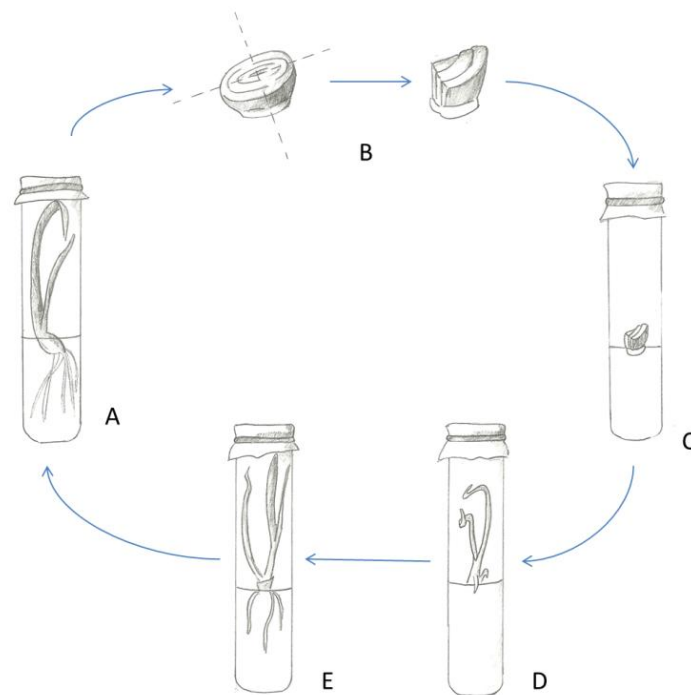


Figura 5. Esquema de regeneración cíclica para eliminar la dominancia apical en el cultivo de meristemas de chalote

A. Bulbo obtenido del proceso de regeneración de meristemas (Figura 1) en el medio embulbamiento. B. Corte del bulbo resultante en cuatro pedazos inhabilitando el meristema apical. C. Explante obtenido colocado en medio de inducción. D. Plántula en el medio de inducción luego de cuatro semanas. E. Plántula en medio de crecimiento – sin hormonas- luego de cuatro semanas más, que puede ser pasada al medio de embulbamiento para reanudar el ciclo. (Adaptado de Rancillac y Teyssendier, 1992)

15 Anexos

Anexo 1. Cuantificación de ARN total extraído de las hojas de las plantas de chalote colectadas

Número de Muestra	ng/uL	A260/280	A260/230
1	506,7	1,24	1,01
2	1203,5	1,56	0,78
3	365,2	1,79	0,35
4	120,5	2,03	0,56
5	456,3	1,76	0,87
6	3451,2	1,08	0,98
7	407,1	1,34	0,57
8	856,3	0,94	0,73
9	734,7	1,85	0,17
10	193,5	1,24	0,67
11	653,0	1,9	0,25
12	432,6	1,03	1,23
13	743,9	0,89	0,76
14	321,4	1,95	0,59
15	237,4	1,09	0,89
16	836,9	2,03	0,76
17	264,6	1,54	0,48
18	543,3	1,78	0,76
19	1452	1,54	0,98
20	346,2	1,29	0,99
21	745,9	1,96	0,67
22	309,1	1,85	0,8
23	463,1	1,76	0,53
24	506,4	2,12	0,48
25	430,8	1,01	0,39
26	934,6	1,23	0,68
27	841,5	1,43	0,75
28	643,2	1,76	0,53
29	237,1	1,32	0,84
30	634,1	1,98	0,38
31	745,2	1,45	0,76
32	534,1	1,1	0,84
33	108,2	1,23	0,78
34	764,9	1,56	0,34
35	964,5	1,63	0,67

36	567	1,76	0,78
37	1234,4	1,45	0,34
38	432,1	1,34	0,89
39	567,2	1,56	0,28
40	321,8	1,98	1,06
41	642,7	1,87	0,46
42	541,8	1,65	0,72
43	963,6	1,73	0,26
44	275,4	1,34	0,79
45	153,5	1,23	0,65
46	245,6	1,67	0,43
47	742,6	1,56	0,82
48	856,3	1,34	0,78
49	934,9	1,9	0,54
50	783,4	1,84	0,85
51	235,6	1,45	0,7
52	372,4	1,12	0,64
53	856,2	1,24	0,89
54	174,6	1,78	0,34
55	208,4	1,65	0,78
Promedio	620,0	1,54	0,67
DE	492,2	0,3	0,2
Max	3451,2	2,12	1,23
Min	108,2	0,89	0,17

Se presenta los resultados de cuantificación de ARN total (ng/uL), índice de absorbancia 260/280 y 260/230 (NanoDrop Thermo scientific 1000) obtenidos para el ARN total extraído de las hojas de las 55 plantas de chalote colectadas. Las muestras se numeran de la 1 a la 55. Se coloca el promedio, la desviación estándar (DE), el máximo (Max) y el mínimo (min).